

# Jagoda Drąg<sup>1</sup>, Anna Gawędzka<sup>1,3</sup>, Magdalena Jurzak<sup>1,2</sup>

1 Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego

2 Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

3 Zakład Farmakologii i Biofizyki Akademii Wychowania Fizycznego

## *Hodowla skóry – techniki molekularne w kosmetologii*

**Streszczenie:** Naskórek jest tkanką ulegającą ciągłej odnowie i regeneracji. Utrzymanie odpowiedniej równowagi i odnowy naskórka możliwe jest dzięki właściwościom regeneracyjnym komórek macierzystych, prekursorów keratynocytów. Komórki macierzyste naskórka biorą również udział w procesie gojenia się ran, a także w patogenezie nowotworów skóry. Wyhodowane ludzkie keratynocyty i komórki macierzyste naskórka mogą być przeszczepiane w postaci opatrunków w leczeniu oparzeń, chronicznych owrzodzeń oraz różnych chorób skóry. Komórki macierzyste naskórka stanowią cel terapii genowej oraz materiał do testowania nowych leków. W skórze właściwej licznie występują fibroblasty, odpowiedzialne za syntezę kolagenu i elastyny zapewniających elastyczność skóry. Główną funkcją fibroblastów jest utrzymanie strukturalnej integralności tkanek łącznych poprzez wydzielanie prekursorów macierzy zewnątrzkomórkowej, ponadto zawierają błonowe białka uczestniczące w procesach adhezji, integrujące komórki i składniki substancji międzykomórkowej. Fibroblasty są materiałem wykorzystywanym do przeszczepów w leczeniu oparzeń, blizn oraz trudno gojących się ran. Funkcje keratynocytów i fibroblastów są szeroko wykorzystywane w hodowlach komórek i tkanek. Uzyskane *in vitro* komórki stosowane są w transplantologii. W kosmetologii wykorzystuje się hodowle jednego typu komórek (keratynocytów czy fibroblastów), kokultury, a także tzw. modele skóry, np. model naskórka czy model skóry pełnej. Modele skóry znalazły zastosowanie do badania wpływu substancji kosmetycznych na ekspresję genów, syntezę białek i badanie aktywności wielu enzymów. Hodowle komórkowe pozwalają na obserwację wpływu różnych czynników na zachowanie się komórek skóry zdrowej oraz w warunkach patologicznych takich, jak bielactwo, czerniak lub łuszczyca.

**Słowa kluczowe:** skóra, hodowla fibroblastów, komórki macierzyste skóry

**Abstract:** The epidermis is a continuously tissue renewal and regeneration. Maintaining the right balance and skin health is possible thanks to regenerative properties of stem cells, the precursors of keratinocytes. Epidermal stem cells are also involved in wound healing and in the pathogenesis of skin cancers. Cultured human keratinocytes and the epidermal stem cells may be transplanted in the form of wound dressings for the treatment of burns, chronic ulcers and various skin conditions. Epidermal stem cells are a target for gene therapy, and the material for testing new drugs. In the dermis there are numerous fibroblasts, responsible for the synthesis of collagen and elastin, providing flexibility to the skin. The main function of fibroblasts is to maintain the structural integrity of the connective tissue through extracellular matrix secretion of the precursors, they also contain membrane proteins involved in adhesion processes, and integrating the components of the cell matrix. Fibroblasts are the material used for transplantation in the treatment of burns, scars and wounds difficult to heal. The functions of keratinocytes and fibroblasts are widely used in cell cultures and tissue. Cells obtained *in vitro* are used in transplantation. In cosmetology cultures used one type of cells (keratinocytes and fibroblasts), co-culture, as well as the so-called. models

such as skin epidermis model or full-skin model. Skin models have been used to study the effect of cosmetic ingredients for gene expression, protein synthesis and testing activity of many enzymes. Cell cultures allow the observation of various factors influence the behavior of cells in the skin of healthy and pathological conditions such as vitiligo, psoriasis, or melanoma.

**Key words:** skin, fibroblast culture, skin stem cells

Skóra jest organem nieustannie się zmieniającym, który zawiera wiele wyspecjalizowanych komórek i struktur. Chroni organizm przed zakażeniem drobnoustrojami, czynnikami mechanicznymi, termicznymi, chemicznymi, promieniowaniem świetlnym oraz zapewnia homeostazę. Zbiera informacje sensoryczne z otoczenia, odgrywa aktywną rolę w układzie odpornościowym oraz bierze udział w magazynowaniu i przemianie materii. Zrozumienie złożoności funkcji skóry wiąże się z budową trzech warstw skóry, tj. naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej.

Naskórek jest tkanką ulegającą ciągłej odnowie i regeneracji, cechuje ją bardzo zwarta budowa komórkowa, którą w około 80% stanowią keratynocyty będące na różnych etapach rogowacenia. Proces różnicowania tych komórek tworzy wyraźnie wyodrębnione warstwy, takie jak warstwa podstawna z aktywnie dzielącymi się komórkami, warstwa kolczysta składająca się z wielokątnych komórek zawierających rozbudowany cytoszkielet, warstwa ziarnista zawierająca kilka pokładów spłaszczonych komórek zawierających ziarnistości, w których znajdują się substancje regulujące proces rogowacenia, warstwa jasna zbudowana z komórek obumierających oraz warstwa zrogowaciała, utworzona przez kilka do kilkudziesięciu pokładów korneocytów. Na każdym etapie różnicowania się keratynocytów, przejście z warstwy podstawnej naskórka do warstwy rogowej trwa średnio 30 dni, w którym to czasie dochodzi do ekspresji keratyn oraz innych markerów, takich jak inwolukryna, kornifina czy lorykryna. Keratynocyty odgrywają zasadniczą rolę w utrzymaniu bariery naskórkowej, a wraz z komórkami Langerhansa – także w procesach immunologicznych skóry. W połączeniu z melanocytami (komórkami barwnikowymi) uczestniczą w procesach syntezy barwnika w skórze. Komórki Merkla zlokalizowane w warstwie podstawnej produkują neurotransmitery i odpowiadają za kontakt z włóknami nerwowymi i za odbieranie wrażeń czuciowych [4, 7, 20].

W skórze właściwej wyróżnić można warstwę brodawkową oraz warstwę siateczkowatą. Warstwa brodawkowa uwypukla się w obręb naskórka tworząc brodawki skórne. Spełnia ważną rolę w metabolizmie skórno-naskórkowym. W warstwie siateczkowatej znajdują się włókna kolagenowe i elastynowe, substancja podstawowa oraz komórki mięśni gładkich. W składzie komórkowym w skórze właściwej licznie występują fibroblasty, odpowiedzialne za syntezę włókien kolagenowych, siateczkowych i sprężystych za-

pewniających elastyczność, jędrność i odpowiednie napięcie skóry. Poziome włókna kolagenu i pionowe włókna elastyny tworzą siateczkę, stanowiącą rusztowanie dla struktury naskórka. Fibroblasty odpowiadają za wytwarzanie składników substancji podstawowej takich jak proteoglikany oraz białka niekolagenowe. Komórki te utrzymują strukturalną integralność tkanek łącznych poprzez wydzielanie błonowych białek uczestniczących w procesach adhezji, integrując w ten sposób komórki i składniki substancji międzykomórkowej. Fibroblasty syntetyzują w formie proenzymu stromielizynę oraz żelatynazę, a także inhibitory kolagenaz. W ten sposób, produkując zarówno elementy substancji pozakomórkowej, jak i degradujące ją enzymy, fibroblasty mogą nie tylko wytwarzać i kształtować macierz w okresie rozwoju organizmu, ale także przebudowywać ją w razie potrzeby. Szczególnie ważna jest synteza wspomnianych składników w procesie gojenia się ran, oparzeniach oraz w fizjologicznym starzeniu się skóry.

Tkanka podskórna jest najgłębszą i najgrubszą warstwą skóry. Składa się głównie z adipocytów i dlatego ma istotne znaczenie dla izolacji cieplnej organizmu. Jednocześnie funkcjonuje jako amortyzator, chroniąc niżej położone tkanki przed wstrząsami i urazami [4, 7, 17, 19].

Prawidłowe funkcjonowanie oraz wygląd skóry są bezpośrednio związane ze stanem odżywienia oraz unerwienia, a także z obecnością wyspecjalizowanych komórek, takich jak keratynocyty i fibroblasty. Czynniki wpływającymi na proliferację keratynocytów są p63 (czynnik transkrypcyjny, zapobiega różnicowaniu się komórek macierzystych naskórka do keratynocytów), witamina A i jej analogii, naskórkowy czynnik wzrostu oraz TNF $\alpha$ . Czynniki sprzyjającymi różnicowaniu keratynocytów są stężenie jonów wapnia, z gradientem zwiększającym się od warstwy podstawnej do warstwy rogowej, witamina D3, regulująca ekspresję genów zaangażowanych w różnicowanie keratynocytów, katepsyna E oraz kortyzol. Do keratynocytów dociera najwięcej szkodliwego promieniowania ultrafioletowego, stąd na nich określa się ochronny wpływ substancji kosmetycznych. Komórki naskórka wykorzystywane są także do badania ekspresji genów, syntezy białek i aktywności enzymów [2, 11, 19, 23].

Fibroblasty były pierwszymi komórkami adherentnymi, które udało się hodować *in vitro*. W hodowlach pierwotnych uzyskanych z komórek różnych typów, to zwykle fibroblasty wykazywały najintensywniejszy wzrost i przetrwały komórki adherentne innych typów. Wykorzystując fibroblasty poznano szkodliwy wpływ promieni UVA na materiał genetyczny i utratę zdolności fibroblastów do regeneracji skóry. Określono, że za negatywny skutek działania promieni UV odpowiedzialna jest nadmierna aktywacja metalopro-

teinaz, które niszczą włókna kolagenowe, przez co następuje zmniejszenie ogólnej ilości kolagenu w skórze, w konsekwencji prowadząc do obniżenia jędrności skóry i tworzenia głębokich zmarszczek. W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy kontrolują skład macierzy zewnątrzkomórkowej, podtrzymując prawidłową regenerację skóry. Fibroblasty w hodowlach służą jako podłoże dla innych komórek (tzw. kokultury), do oceny wpływu czynników chemicznych na żywe komórki, a także są stosowane jako model w badaniach kosmetycznych i w terapiach kosmetycznych do usuwania blizn i zmarszczek, oraz w badaniach medycznych jako komórki gospodarze dla stosowanych w terapiach wirusów. Fibroblasty są dobrym materiałem do badania wpływu składników kosmetyków na ekspresję genów, syntezę białek i badanie aktywności wielu enzymów [7, 17, 25].

Stały postęp w badaniach zaciera granice pomiędzy poszczególnymi dziedzinami nauki, co sprawia, że staje się ona coraz bardziej interdyscyplinarna. Bez wykorzystania wiedzy z dziedzin takich, jak inżynieria, technika czy informatyka, nie jest możliwy rozwój w badaniach biologii molekularnej. Duża liczba danych oraz technik, jakie ewoluowały na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci, przyczyniła się do rozwoju specyficznych obszarów zainteresowań w biologii komórki. Genomika zajmuje się poznaniem i analizą genomu, transkryptomika zespołem wszystkich mRNA (transkryptomem), proteomika białkami, a metabolomika badaniem metabolitów obecnych w organizmie, tkance czy komórce. Postęp w dziedzinach biologii molekularnej, a w tym także w kosmetyce, przyniosło zsekwencjonowanie ludzkiego genomu. Przede wszystkim stworzyło możliwość porównania cech prawidłowej i patologicznie zmienionej tkanki na poziomie genomu. Jedną z największych korzyści wynikających z zsekwencjonowania genomu jest rozwój techniki mikromacierzy (microarray). W genomice mikromacierze najczęściej są wykorzystywane do oceny ekspresji genów, lecz mogą także być przydatne w identyfikacji mutacji. Proteomika zajmuje się ustaleniem wzoru ekspresji białek i ich sekwencji oraz modyfikacji potranslacyjnych. Oznaczanie poziomu białka uzupełnia informacje uzyskane z analizy mRNA, ekspresja genów może bowiem być modulowana na poziomie zarówno transkrypcji, jak i translacji. Proteomika zajmuje się głównie dwoma działami, takimi jak charakterystyka ekspresji białek i charakterystyka funkcji białek na podstawie oceny aktywności białek i ich oddziaływania między sobą. Najczęściej stosowanymi metodami są immunoblotting, immunoprecypitacja, histochemia i mikromacierze białkowe. Dzięki lepszemu poznaniu wzajemnych zależności między białkami, ta gałąź proteomiki może służyć do znalezienia nowych celów dla terapii ukierunkowanej, ocenić mechani-

zmy oporności na dany lek, wpływ składników chemicznych i kosmetyków lub monitorować odpowiedź na terapię ukierunkowaną. Cytomika z kolei służy do oceny zróżnicowania fenotypów komórek w próbkach, na podstawie wyróżnienia w niej różnych typów komórek znajdujących się w różnych stanach funkcjonalnych. Metody w obszarze cytomiki pozwalają ocenić wiele parametrów w jednej komórce z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, która obecnie umożliwia analizę ekspresji do 17 białek w jednej komórce.

Podsumowując – rozwój technik biologii molekularnej, biotechnologii oraz metod badawczych w dziedzinie inżynierii tkankowej, w połączeniu z zaawansowanymi narzędziami bioinformatycznymi, dostarczyły znaczną ilość danych, które przyczyniły się do opracowania metod prewencji oraz profilaktyki w zakresie funkcjonowania skóry. Przydatność wymienionych dziedzin znalazła zastosowanie w wyjaśnieniu mechanizmów gojenia się ran, kancerogenezie, przeszczepów komórek, terapii genowej oraz badaniach toksykologicznych [1].

Poszukiwanie nowych możliwości, badań, narzędzi oraz modeli doświadczalnych w kosmetologii zostało wymuszone przez ograniczenia prawne dotyczące badań na zwierzętach. Od września 2004 r. obowiązuje zakaz testowania gotowych produktów kosmetycznych na zwierzętach, a od marca 2009 r. zakaz testowania składników lub kombinacji składników. W UE zabronione jest również wprowadzanie do obrotu produktów kosmetycznych i ich składników, które były testowane na zwierzętach, niezależnie od pochodzenia tych produktów. Wprowadzenie powyższych ograniczeń pobudziło zainteresowanie w przemyśle kosmetycznym poszukiwaniem metod alternatywnych, takich jak hodowle *in vitro* komórek skóry, do badań wpływu surowców kosmetycznych i kosmetyków na skórę. Hodowle *in vitro* komórek skóry (keratynocytów i fibroblastów) są najlepszym obecnie dostępnym modelem skóry oraz najodpowiedniejszym narzędziem do badań w kosmetologii [8].

Zależnie od rodzaju prowadzonych doświadczeń w kosmetologii wykorzystuje się jednorodne hodowle *in vitro* komórek izolowanych ze skóry ludzkiej (keratynocyty, fibroblasty, melanocyty, komórki Langerhansa), linie komórkowe (komórki modyfikowane genetycznie, komórki immortalizowane, komórki w różnym stadium transformacji czy różnicowania), kokultury różnych typów komórek (keratynocyty z melanocytami, keratynocyty z komórkami układu odpornościowego). Hodowle komórek skóry, zarówno jednorodne, jak i kokultury komórek, np. keratynocytów z melanocytami, są doskonałym modelem do badań podstawowych w kosmetologii. Umożliwiają prowadzenie na poziomie komórkowym i molekularnym badań nad działaniem ksenobiotyków zawartych w kosmetykach oraz nad wpływem czynników zewnętrznych

(np. promieniowanie UV) na fizjologię skóry. Dzięki hodowlom komórkowym możliwa jest również obserwacja zmian poziomu uwalnianych przez komórki cytokin i interleukin po zastosowaniu czynnika aktywnego, co pozwala na dalsze badania ewentualnych reakcji alergicznych lub odpowiedzi układu immunologicznego na działanie drażniące ksenobiotyków. Doświadczenia na hodowlach komórkowych *in vitro* pozwalają na określenie optymalnych dla komórek skóry stężeń ksenobiotyków. W wielu laboratoriach kosmetycznych na świecie badania nad czynnikami aktywnymi przeprowadza się na liniach komórkowych. W porównaniu z komórkami pochodzącymi z izolacji są one bardziej wytrzymałe i łatwiejsze w hodowli [7, 17, 18].

Wyhodowane ludzkie keratynocyty mogą być przeszczepiane w postaci opatrunków w leczeniu oparzeń, chronicznych owrzodzeń oraz różnych chorób skóry. Komórki macierzyste naskórka stanowią cel terapii genowej oraz materiał do testowania nowych leków. Fibroblasty są materiałem wykorzystywanym w transplantologii w leczeniu oparzeń, blizn oraz trudno gojących się ran. W kosmetyce wykorzystuje się tzw. modele skóry, np. model naskórka czy model skóry pełnej. Modele skóry znalazły zastosowanie do badania wpływu substancji kosmetycznych na ekspresję genów, syntezę białek i badanie aktywności wielu enzymów [4, 7, 17].

Techniki biologii molekularnej szeroko wykorzystywane w ocenie funkcji i budowy komórek skóry to reakcja PCR, RT-PCR, metody immunoblotingu (Western Blot, Northern Blot) oraz metody immunoenzymatyczne (np. ELISA). Dodatkowo panele badań poszerza się o cytometrię przepływową, techniki chromatograficzne oraz nanotechnologie [18].

Spośród technik biologii molekularnej najczęściej wykorzystuje się reakcję PCR, RT-PCR oraz metody takie, jak Western Blot i ELISA.

Reakcja RT-PCR dzieli się na dwa zasadnicze etapy: reakcję odwrotnej transkrypcji z udziałem odwrotnej transkryptazy oraz amplifikacja cDNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji (*Reverse Transcription*, RT) umożliwia utworzenie cDNA na matrycy RNA, który jest stabilniejszy niż RNA oraz może być amplifikowany za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Reakcja syntezy cDNA może być przeprowadzona z zastosowaniem heksamerów, oligo(dT) lub startera specyficznego dla analizowanego genu. Otrzymany cDNA może być wykorzystany do oceny ekspresji genu na poziomie mRNA w reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów [13].

Metoda Western Blot (Immunoblotting) pozwala na detekcję określonego rodzaju białka w mieszaninie białek. Możliwe jest także jednoczesne określenie wielkości białka względem znanego standardu białkowego. Isto-

tą techniki jest przeniesienie białek rozdzielonych elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym na membranę, immunodetekcji przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych i uwidocznieniu powstałego kompleksu antygen–przeciwciało. Najczęściej stosowanymi znacznikami kompleksu antygen–przeciwciało są enzymy, z których najczęściej wykorzystuje się peroksydazę chrzanową (*horseradish peroxidase*, HRP), fosfatazę alkaliczną (*alkaline phosphatase*, AP) lub oksydazę glukozową. Metody immunodetekcji powstałych kompleksów antygen–przeciwciało dzieli się na bezpośrednie i pośrednie. Pierwsza z nich wykorzystuje połączenie znacznika z przeciwciałem pierwszorzędowym. W metodzie pośredniej znacznik przyłączony jest do przeciwciała drugorzędowego skierowanego przeciwko przeciwciału I – rzędowemu, przez co następuje wzmocnienie sygnału pochodzącego od znacznika [12, 22].

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) jest jednym z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach biomedycznych, zarówno naukowych, jak i diagnostycznych. Służy do wykrycia określonych białek w badanym materiale z użyciem przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem. Zasada działania testu polega na wiązaniu przeciwciała monoklonalnego, związane z określonym enzymem, które rozpoznaje dane białko zawarte w materiale badanym, a które zostało wcześniej unieruchomione na powierzchni płytki. Po dodaniu przeciwciał tworzą się kompleksy immunologiczne, w wyniku czego przeciwciało zostaje także unieruchomione. Niezwiązane przeciwciała są wypłukiwane, następnie dodawany jest substrat dla enzymu związanego z przeciwciałami. Zachodzi reakcja enzymatyczna, czemu towarzyszy powstanie barwnego produktu. Jego wykrycie świadczy o obecności danego białka w materiale badanym, a mierząc ilość powstałego produktu można przeprowadzić analizę ilościową [21].

Przydatność technik biologii molekularnej w kosmetologii wykorzystywana jest na szeroką skalę, co zostało pokrótce ukazane w poniższych przykładach.

Arcydzięgiel (*Angelica dahurica*) jest źródłem furokumaryny, psoralenu, które są potencjalnymi substancjami o właściwościach wybielających. Skład ekstraktu z rośliny został poddany analizie chromatograficznej, a następnie wykorzystując hodowlę komórek nowotworowych czerniaka B16 sprawdzono hamujące działanie wyizolowanych składników na proces melanogenezy. Mechanizm działania wybielającego rośliny powiązano ze spadkiem poziomu ekspresji tyrozynazy. Potwierdzenie przypuszczeń uzyskano poprzez oznaczenie ekspresji tyrozynazy z wykorzystaniem techniki RT-PCR. Na podstawie wyników, autorzy sugerują, że po weryfikacji wyników w warun-

kach *in vivo*, wyciągi z arcydzięgla będą mogły zostać użyte jako nowy składnik wybielający w kosmetykach [3].

Wykorzystanie technik RT-PCR oraz Western Blot pozwoliło na wyjaśnienie mechanizmu zmian degeneracyjnych w procesie złuszczenia keratynocytów pod wpływem miejscowego użycia retinoidów. W tym celu wykorzystano wstępnie hodowle ludzkich keratynocytów, które były inkubowane z kwasem retinowym przez 24 godziny, po tym czasie przeprowadzono oznaczenia ekspresji mRNA oraz białek – desmogleiny (DSG) 1, desmokoliny (DSC) 1 oraz korneodesmozyny. Uzyskane wyniki sugerują, że kwas retinowy spowodował spadek poziomu ekspresji transkryptów dla DSG1 and DSC1, wzrost degradacji korneodesmosomów i w konsekwencji łuszczenie się korneocytów [15].

Wykorzystanie komórek czerniaka B16 umożliwiło zbadanie wpływu ośmiu pochodnych witaminy E na proces melanogenezy i hamujący wpływ na ekspresję i aktywność tyrozynazy, związanej bezpośrednio z tym procesem. Z przeprowadzonych badań z wykorzystaniem techniki odwrotnej transkrypcji wykazano hamujący wpływ dwóch pochodnych witaminy E na ekspresję tyrozynazy oraz białka związanego z tyrozynazą (TRP-2). Te odkrycia sugerują, że zarówno d- $\beta$ -tokoferol i d- $\chi$ -tokoferol mogą być użyteczne jako efektywne składniki kosmetyków wybielających o mniejszej toksyczności dla skóry, aby zapobiec lub poprawić pigmentację skóry w takich zmianach skórnych, jak plamy i piegi spowodowane przez promieniowanie UV [24].

W hodowli ludzkich fibroblastów oraz keratynocytów inkubowanych z ekstraktem z alg (*Chlorella vulgaris*) zbadano wpływ składników glonu na restrukturyzację skóry oraz właściwości ochronne przeciwko promieniowaniu UV. Dla realizacji zamierzonych celów analizowano poziomy ekspresji kolagenu, elastyny, tioredoksyny (TX1 i TX2) oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz wykorzystując techniki RT-PCR, Western Blot, real-time PCR oraz minichipów. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania w kosmetykach glonu *Chlorelli vulgaris* jako składnika o właściwościach antycellulitowych, przeciwzmarszczkowych oraz przeciw starzeniu się skóry [9].

Wpływ promieniowania na proces starzenia się skóry przez remodeling skórnej macierzy zewnątrzkomórkowej był analizowany z wykorzystaniem modelu zwierzęcego (myszy C57/BL6) poddanego naświetlaniu przez okres 182 dni promieniami UVB. Zamierzeniem autorów był poznanie zmian dotyczących ilości i jakości kwasu hialuronowego. Pomiar stężenia kwasu hialuronowego wykonano testem ELISA, analiza na poziomie molekularnym z wykorzystaniem techniki RT-PCR (*reverse transcription*, PCR) obejmowa-



ła ekspresję genów dla syntaz HAS1 do HAS3, czynników wzrostu (TGF)- $\beta$ 1, T $\beta$ 1R-II), hialuronidaz (HYAL1, HYAL2) i in. Przeprowadzone badania wykazały znaczną utratę kwasu hialuronowego pod wpływem UV, spadek ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę HA oraz spadek ekspresji czynników wzrostu [5].

Wykorzystując kompilacje analiz różnych typów, w tym technikę RT-PCR, wykazano po raz pierwszy obecność w skórze dekarboksylazy glutaminianu (GAD), która katalizuje syntezę neuroprzekaźnika GABA. Wykazano ekspresję mRNA oraz białka GAD67 zarówno w skórze myszy, jak i w hodowli ludzkich fibroblastów skóry. Wykazano, że GABA stymuluje syntezę kwasu hialuronowego oraz zwiększa przeżywalność fibroblastów w odpowiedzi na działanie czynników stresu oksydacyjnego [10].

Fotouszkodzenie skóry jest wywołane szeregiem reakcji prowadzących do produkcji reaktywnych form tlenu zwiększających ekspresję metaloproteinaz, które są odpowiedzialne za niszczenie włókien kolagenowych i elastyny. Koenzym Q10 jest uważany za czynnik redukujący powstawanie reaktywnych form tlenu oraz uszkodzeń DNA wywołanych przez promieniowanie UV. Badania pokazały inhibitory wpływ koenzymu Q10 na poziomy MMP-1, PGE-2 oraz IL-6 (testy ELISA) w hodowli ludzkich fibroblastów skóry, co potwierdziło ochronny wpływ koenzymu na skórę w procesie fotostarzenia [6].

Poziom nawilżenia i spójność warstwy rogowej naskórka to ważne czynniki wpływające na wygląd skóry. Obecność akwaporyn oraz innych białek tworzących otoczkę rogową przyczynia się do zwiększenia spójności korneocytów, co polepsza utrzymanie prawidłowego stanu nawilżenia. Brazylijscy naukowcy badali wpływ ekstraktu z Piptadenia colubrina na ekspresję genów kodujących wspomniane białka. Eksperymenty prowadzono w warunkach *in vitro* inkubując hodowlę ludzkich keratynocytów z badanym ekstraktem. Następnie przy użyciu metody Real Time PCR mierzono poziom ekspresji genów dla akwaporyny-3, lorykryny, inwolukryny oraz filagryny. Uzyskane wyniki, sugerują, że badany ekstrakt z Piptadenia colubrina przyczynia się do wzrostu nawodnienia naskórka i indukuje ekspresję genów dla białek otoczki rogowej, co przyczynia się do wzrostu kohezji w obrębie warstwy rogowej, a tym samym pozwala zatrzymywać wodę i substancje nawilżające w skórze. Autorzy podkreślają przydatność zastosowania rośliny jako wartościowego surowca w kosmetologii [16].

Katepsyna jest zaangażowana w mechanizmy regulatorowe w obrębie skóry i posiada zdolność do degradacji włókien kolagenowych. W eksperymentach *in vivo* i *in vitro* badano rolę katepsyn B, D, G i K w zjawisku fo-

tostarzenia. Metody immunohistochemiczne posłużyły do wykrycia zmian zachodzących w skórze pod wpływem długotrwałej ekspozycji na promieniowanie UV. Technika Western blot analizowano natomiast poziom ekspresji katepsyn w fibroblastach, w których wcześniej indukowano fotostarzenie. Za pomocą metody RT-PCR określono poziom mRNA dla tych enzymów w skórze i w fibroblastach. Uzyskane wyniki sugerują, że katepsyny można zastosować jako marker zjawiska starzenia się skóry [26].

Korzystny efekt hormonu wzrostu w procesie gojenia się ran jest powiązany ze stymulacją IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1). Badania przeprowadzone na hodowli fibroblastów oraz keratynocytów, prowadzonych w różnych stężeniach hormonu wzrostu pozwoliły na ocenę proliferacji fibroblastów, migracji keratynocytów oraz poziomu nowosyntetyzowanego IGF-1 (technika RT-PCR). Uzyskane wyniki sugerują, że hormon wzrostu wzmacnia miejscową produkcję IGF-1, który aktywuje proliferację fibroblastów oraz migrację keratynocytów, co może zostać wykorzystane w miejscowym leczeniu ran [14].

Poznanie mechanizmów kontrolujących procesy syntezy, regeneracji i starzenia się skóry jest kluczowe w zrozumieniu fizjologii oraz patologii skóry, a także w umiejętnym zastosowaniu syntetycznych i naturalnych kosmetyków utrzymujących dobrą kondycję skóry. Wykorzystanie technik biologii molekularnej, biotechnologii oraz metod inżynierii tkankowej pozwoliło na realizację tych zadań, co istotnie wpłynęło na wyjaśnienie takich mechanizmów, jak gojenie się ran czy kancerogeneza, z jednoczesnym poszukiwaniem metod terapeutycznych licznych schorzeń skóry.

## Bibliografia

1. Adamczyk A., Zastosowania współczesnych osiągnięć biologii molekularnej w medycynie, *Onkologia Info* 2010, 7, 2: 58–66.
2. Bikle D.D., Vitamin D regulated keratinocyte differentiation, *J Cell Biochem* 2004, 1: 92 (3): 436–44.
3. Cho Y.H., Kim J.H., Park S.M., Lee B.C., Pyo H.B., Park H.D., New cosmetic agents for skin whitening from *Angelica dahurica*, *Cosmet Sci* 2006, 57 (1): 11–21.
4. Chomiczewska D., Trznadel-Budźko E., Kaczorowska A., Rotsztejn H., Znaczenie komórek Langerhansa w układzie immunologicznym skóry, *Pol Merk Lek* 2009, 26: 153, 173.
5. Dai G., Freudenberger T., Zipper P., Melchior A., Grether-Beck S., Rabausch B., de Groot J., Twarock S., Hanenberg H., Homey B., Krutmann J., Reifemberger J.,

- Fischer J.W., Chronic Ultraviolet B Irradiation Causes Loss of Hyaluronic Acid from Mouse Dermis Because of Down-Regulation of Hyaluronic Acid Synthases, *Am J Pathol* 2007, 171 (5): 1451–1461.
6. Fuller B., Smith D., Howerton A., Kern D. Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids, *J Cosmet Dermatol* 2006, 5 (1): 30–38.
7. Gojniczek K., Garnarczyk A., Pytel A., Hodowle komórek in vitro w kosmetologii, *Wiad Lek* 2005, 58 (1–2): 71–77.
8. [www.kosmopedia.org/o\\_kosmetykach/kosmetyki\\_a\\_testy\\_na\\_zwierzet](http://www.kosmopedia.org/o_kosmetykach/kosmetyki_a_testy_na_zwierzet).
9. [www.osmosisskincare.com/research/files/chlorella-extract-on-skin.pdf](http://www.osmosisskincare.com/research/files/chlorella-extract-on-skin.pdf).
10. Ito K., Tanaka K., Nishibe Y., Hasegawa J., Ueno H., GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: evidence for a new skin function, *Biochim Biophys Acta* 2007, 1770 (2): 291–296.
11. Kawakubo T., Yasukochi A., Okamoto K., Okamoto Y., Nakamura S., Yamamoto K., The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes, *Biological Chemistry* 2011, 392 (6): 571–585.
12. Kłyszewko-Stefanowicz L., Ćwiczenia z biochemii, PWN, Warszawa 2005: 181–198.
13. Korcz A., Lipiński D., Mikołajczyk-Stecyna J., Słomski R., Synteza cDNA na matrycy RNA, [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008: 176–182.
14. Lee S.W., Kim S.H., Kim J.Y., Lee Y., The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration, *Reconstr Aesthet Surg* 2010, 63 (4): 364–369.
15. Moon Young K., Sang Eun L., Jae Yong Ch., Soo-Chan K., Retinoid Induces the Degradation of Corneodesmosomes and Downregulation of Corneodesmosomal Cadherins: Implications on the Mechanism of Retinoid-induced Desquamation, *Ann Dermatol* 2011, 23 (4): 439–447.
16. Pereda Mdel C., Dieamant Gde C., Eberlin S., Werka R.M., Colombi D., Queiroz M.L., Di Stasi L.C., Expression of differential genes involved in the maintenance of water balance in human skin by Piptadenia colubrina extract, *J Cosmet Dermatol* 2010, 9 (1): 35–43.
17. Piśula M., Trzonkowski P., Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie, *Post Hig Med Dosw* (online) 2009, 63: 449–456.
18. Potargowicz E., Perspektywy biologii molekularnej w kosmetologii, *Pol J Cosmetol* 2011, 14 (1): 2–16.
19. Proksch E., Brandner J., Jensen J.M., The skin: an indispensable barrier, *Exper Dermatol* 2008, 17 (12): 1063–1072.
20. Sawicki W., *Histologia*, PZWL, Warszawa 2005: 515–522.
21. Stryer L., *Biochemia*, PWN, Warszawa 2003: 61–62.
22. Szalata M., Pławski A., Słomski R., Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym, [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008: 503–511.

23. Truong A.B., Kretz M., Ridky T.W., Kimmel R., Khavari P.A., P63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes, *Genes & Develop* 2006, 20 (22): 3185–3197.
24. Yuto K., Yuri O., Kouichi A., Comparison of the inhibitory effects of vitamin E analogues on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells, *Cytotechnology* 2009, 59 (3): 183–190.
25. Zegarska B., Woźniak M., Wpływ estrogenu na zmiany zachodzące w skórze, *Przegl Menop* 2007, 4: 233–238.
26. Zheng Y., Lai W., Wan M., Maibach H.I., Expression of cathepsins in human skin photoaging, *Skin Pharmacol Physiol* 2011, 24 (1): 10–21.